

**Destruction of contaminating tumor cells in stem cell transplants using bispecific antibodies**

Patent Number: ☐ US5985276  
Publication date: 1999-11-16  
Inventor(s): LINDHOFFER HORST (DE); MENZEL HELGE (DE); KOLB HANS-JOCHEM (DE);  
THIERFELDER STEFAN (DE)  
Applicant(s): GSF FORSCHUNGSZENTRUM UMWELT (DE)  
Requested  
Patent: ☐ DE19649223  
Application  
Number: US19970922966 19970903  
Priority Number  
(s): DE19961035743 19960903; DE19961049223 19961127  
IPC Classification: A61K39/395; C07K16/28; C07K16/30  
EC Classification: C07K16/28A12, C07K16/30, C07K16/46D  
Equivalents: ☐ EP0826695, B1, ☐ JP10179151, JP3257970B2

---

**Abstract**

---

The present invention discloses a procedure for the destruction of contaminating tumor cells in stem cell transplants ex vivo using intact bispecific antibodies.

---

Data supplied from the esp@cenet database - I2

POWERED BY **Dialog****Destruction of tumour cells in stem cell grafts - with bispecific antibody comprising intact antibodies****Patent Assignee:** GSF-FORSCHUNGSZENTRUM UMWELT & GESUNDHEI; GSF FORSCHUNGSZENTRUM UMWELT & GESUNDHEI**Inventors:** KOLB H; LINDHOFFER H; MENZEL H; THIERFELDER S**Patent Family**

Patent Number	Kind	Date	Application Number	Kind	Date	Week	Type
EP 826695	A1	19980304	EP 97115188	A	19970902	199815	B
DE 19649223	A1	19980305	DE 1049223	A	19961127	199815	
DE 19710497	C2	19980709	DE 1010497	A	19970313	199831	
DE 19649223	C2	19980730	DE 1049223	A	19961127	199834	
JP 10179151	A	19980707	JP 97238745	A	19970903	199837	
JP 10182487	A	19980707	JP 97238746	A	19970903	199837	
US 5985276	A	19991116	US 97922966	A	19970903	200001	
US 6210668	B1	20010403	US 97922966	A	19970903	200120	
			US 99422878	A	19991021		
EP 826695	B1	20011212	EP 97115188	A	19970902	200204	
DE 59705741	G	20020124	DE 505741	A	19970902	200208	
			EP 97115188	A	19970902		
JP 3257970	B2	20020218	JP 97238745	A	19970903	200219	

**Priority Applications (Number Kind Date):** DE 1049223 A ( 19961127); DE 1035743 A ( 19960903); DE 1048976 A ( 19961126)

**Patent Details**

Patent	Kind	Language	Page	Main IPC	Filing Notes
EP 826695	A1	G	12	C07K-016/46	
Designated States (Regional): AL AT BE CH DE DK ES FI FR GB GR IE IT LI LT LU LV MC NL PT RO SE SI					
DE 19649223	A1		8	A61K-039/395	
DE 19710497	C2			A61K-039/395	
DE 19649223	C2			A61K-039/395	
JP 10179151	A		7	C12N-005/10	
JP 10182487	A		12	A61K-039/395	
US 5985276	A			A61K-039/395	

US 6210668	B1			A61K-039/395	Continuation application US 97922966
					Cont of patent US 5985276
EP 826695	B1	G		C07K-016/46	
Designated States (Regional): AT BE CH DE DK ES FR GB IT LI NL SE					
DE 59705741	G			C07K-016/46	Based on patent EP 826695
JP 3257970	B2		7	C12N-005/10	Previous Publ. patent JP 10179151

**Abstract:**

EP 826695 A

Method for reducing the number of tumour cells in a stem cell graft ex vivo comprises contacting the graft with an intact bispecific antibody (a hybrid antibody comprising two different Fab fragments and an Fc fragment) that is (A) capable of binding to receptors on T-cells and other cells bearing Fc receptors and (B) capable of binding to a tumour-associated antigen on the tumour cells.

USE - The method is especially used for treating stem cell autografts from patients with mammary and/or ovarian carcinoma, leukaemia, lymphoma, testicular carcinoma or other chemotherapy-sensitive carcinomas.

ADVANTAGE - The bispecific antibody not only targets T cells to the tumour cells but also (unlike bispecific antibodies comprising F(ab)2 fragments) stimulates cytokine release by the T cells and activates accessory cells bearing Fc receptors, e.g. monocytes, macrophages and dendritic cells, giving a 10- to 1000-fold increase in tumour cell destruction.

Dwg.0/1

Derwent World Patents Index

© 2002 Derwent Information Ltd. All rights reserved.

Dialog® File Number 351 Accession Number 11744169



DEUTSCHES  
PATENTAMT

21 Aktenzeichen: 196 49 223.8-41  
22 Anmeldetag: 27. 11. 96  
43 Offenlegungstag: 5. 3. 98  
45 Veröffentlichungstag  
der Patenterteilung: 30. 7. 98

Innerhalb von 3 Monaten nach Veröffentlichung der Erteilung kann Einspruch erhoben werden

66 Innere Priorität:  
196 35 743. 8 03. 09. 96

73 Patentinhaber:  
GSF - Forschungszentrum für Umwelt und  
Gesundheit GmbH, 85764 Oberschleißheim, DE

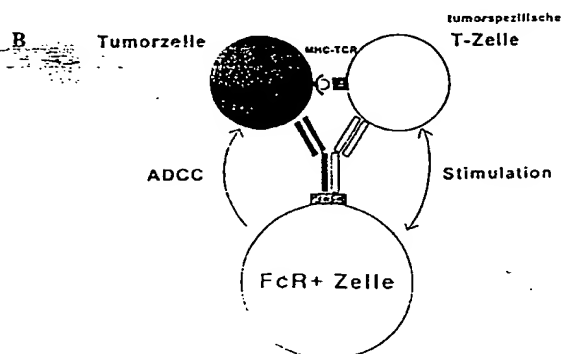
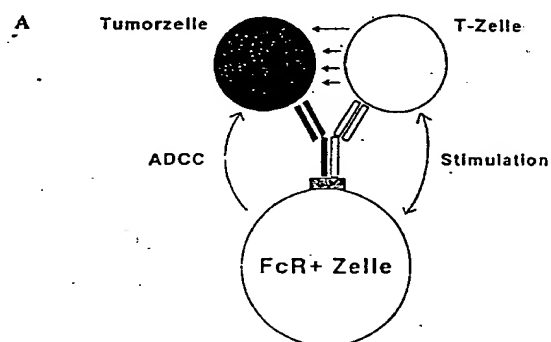
74 Vertreter:  
PAe Reinhard, Skuhra, Weise & Partner, 80801  
München

72 Erfinder:  
Lindhofer, Horst, Dr., 82194 Gröbenzell, DE; Menzel,  
Helge, Dr., 81379 München, DE; Kolb,  
Hans-Jochem, Prof. Dr., 80804 München, DE;  
Thierfelder, Stefan, Prof. Dr., 82223 Eichenau, DE

56 Für die Beurteilung der Patentfähigkeit in Betracht  
gezogene Druckschriften:  
DE 44 19 399 C1  
Kaneko, T. et al., Blood 81(5), 1993, 1333-41;

54 Zerstörung von kontaminierenden Tumorzellen in Stammzelltransplantaten mit bispezifischen Antikörpern

57 Verfahren zur Verminderung der Anzahl kontaminie-  
render Tumorzellen in Stammzelltransplantaten ex vivo,  
dadurch gekennzeichnet, daß intakte bispezifische Anti-  
körper, die sowohl an den T-Zellrezeptor-Komplex einer  
T-Zelle, an den Fc-Rezeptor von Fc-Rezeptor-positiven Zel-  
len als auch an tumorassoziierte Antigene auf einer Tu-  
morzelle binden können, mit Stammzelltransplantaten,  
die kontaminierende Tumorzellen enthalten können, in  
Kontakt gebracht werden, um die Anzahl an kontaminie-  
renden Tumorzellen im Stammzelltransplantat zumindest  
zu verringern.



Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Zerstörung von kontaminierenden Tumorzellen in Stammzelltransplantaten ex vivo unter Verwendung intakter bispezifischer Antikörper.

Bei etwa 43 000 Neuerkrankungen/Jahr steht Brustkrebs an der Spitze der Krebsstatistik für Frauen in Deutschland. Weniger als ein Drittel der Frauen mit Lymphknotenbefall bei Diagnose leben 10 Jahre ohne Rückfall.

Vor diesem Hintergrund wird seit einigen Jahren versucht, mit Hilfe der autologen Knochenmark- und Blutstammzell-Transplantation in Verbindung mit der Hoch-Dosis-Therapie Patientinnen mit ausgedehntem Lymphknotenbefall und Fernmetastasen eine Lebensverlängerung oder sogar Heilung zu ermöglichen. Trotz hoher Ansprechraten bei der Hoch-Dosis-Therapie ist eine Heilung im metastasierten Stadium selten.

Die Therapie des metastasierten Mammakarzinoms ist heute fast ausschließlich palliativ. In klinischen Phase-1-Studien konnte gezeigt werden, daß eine Hochdosis-Chemotherapie (HD-CT), gefolgt von einer autologen Knochenmark- oder Stammzelltransplantation (aPBSZT), bei Patientinnen mit chemotherapiesensitivem metastasierten Mammakarzinom klinische Vollremissionen herbeiführen kann. Die Remissionen sind jedoch zeitlich begrenzt (1, 8-11), meistens kommt es zu einem Rezidiv. Dabei kann ein Rezidiv aus klonogenen Tumorzellen entstammen, die mit dem Transplantat reinfundiert wurden und/oder aus solchen, die die HD-CT in der Patientin überlebt haben. Mikrometastasen können im Knochenmark nach Chemotherapie mit der sensitiven RT-PCR für CK19 bzw. ep-cam, beispielsweise C215, und mit Immunzytologie nachgewiesen werden. Sie sind mit einer ungünstigen Prognose selbst nach HD-CT und autologer Stammzelltransplantation verknüpft (2). Neue Konzepte zur Elimination von minimal residual disease (MRD) und zur Reinigung der Transplantate von kontaminierenden Tumorzellen erscheinen daher notwendig. Nach Erreichen einer Remission besteht MRD vermutlich überwiegend aus Tumorzellen, die gegenüber antiproliferativer Chemotherapie durch Verharren in einem Ruhezustand (kinetische Resistenz) oder Ausprägung biochemischer Mechanismen, wie z. B. multi drug resistance (MDR), resistent sind.

Ein wesentliches Problem bei der autologen Stammzelltransplantation ist die Kontamination des Transplantats mit Tumorzellen, welche zum Auftreten eines späteren Rezidivs beim Patienten beitragen können (12, 13). Um Stammzelltransplantate von kontaminierenden Tumorzellen zu reinigen, wurde bisher hauptsächlich das "Purging" mit immunomagnetischen Beads eingesetzt. Dabei werden Tumorzellen aufgrund gebundener, eisentrager Antikörper an einem Magneten zurückgehalten und damit aus dem Transplantat entfernt. Nachteile sind der hohe zeitliche und technische Aufwand und die damit verbundenen hohen Kosten (ca. 20 000.- DM/Patient). Nach einer solchen in vitro-Verminde- rung der Zahl residueller Tumorzellen kann dennoch – wenn auch verzögert – ein Rezidiv auftreten. Dies liegt wahrscheinlich an der Beschränkung dieser Methode auf das Stammzelltransplantat sowie an Tumorzellen, die sich einem derartigen mechanistischen Ansatz, z. B. durch "Verklumpung mit normalen Zellen", entziehen.

Aus diesen Gründen wurden andere immunologische Ansätze zur Reinigung des Stammzelltransplantats erprobt, wie z. B. die Zugabe aktivierter T-Zellen in Kombination mit bispezifischen F(ab')<sub>2</sub>-Fragmenten zur Redirektion von T-Zellen an Tumorzellen (14) in vitro. Es zeigte sich, daß hämatopoetische Stammzellen durch ein derartiges Purgen zwar nicht in ihrer Funktion – gemessen in Proliferations-Assays – beeinträchtigt werden. Die Fähigkeit zur Tumorzell-Zerstörung war in diesen Versuchen jedoch relativ beschränkt (1-2 log Tumorreduktion). Als Nachteil dieses Ansatzes muß auch die Verwendung von zwei Wochen lang kultivierten, präaktivierten T-Zellen angesehen werden, welche den Aufwand hochtreiben und eine Anwendung in der Klinik erschweren.

Die Veröffentlichung (15) betrifft einen bispezifischen Antikörper, der eine durch Cytokin induzierte und durch Killerzellen vermittelte Cytolyse von AML-Zellen bewirkt. Bei dem verwendeten bispezifischen Antikörper handelt es um F(ab')<sub>2</sub>-Fragmente, die die im vorhergehenden Absatz genannten Nachteile aufweisen.

Es ist eine Aufgabe der vorliegenden Erfindung, ein neues Verfahren zur Verminderung der Anzahl kontaminierender Tumorzellen in Stammzellpräparaten bereitzustellen, das die aus dem Stand der Technik bekannten Nachteile vermeidet. Diese Aufgabe wird erfindungsgemäß durch das im Anspruch 1 gekennzeichnete Verfahren gelöst. Bevorzugte Ausgestaltungen des Verfahrens ergeben sich aus den Unteransprüchen und aus der nachfolgenden Beschreibung mit den Beispielen.

Die anliegende Abbildung dient zur weiteren Veranschaulichung der Erfindung.

Die Abb. 1 zeigt die Rolle von akzessorischen Zellen bei der Tumor-Immuntherapie mittels bispezifischer Antikörper (ADCC = Antibody dependent cell mediated Cytotoxicity).

Bispezifische Antikörper können mit einem Bindungsarm an den T-Zellrezeptor-Komplex der T-Zelle, mit dem zweiten Bindungsarm an tumorassoziierte Antigene auf der Tumorzelle binden. Sie aktivieren dabei T-Zellen, die durch Freisetzung von Zytokinen die Tumorzellen zerstören. Darüber hinaus besteht die Möglichkeit, daß T-Zellen im Rahmen der Aktivierung mit bispezifischen Antikörpern tumorspezifische Antigene über ihren Rezeptor erkennen und dadurch eine dauerhafte Immunisierung eingeleitet wird. Von besonderer Bedeutung ist dabei der intakte Fc-Teil des bispezifischen Antikörpers, der die Bindung an akzessorische Zellen wie z. B. Monozyten/Makrophagen/Dendriten vermittelt und diese veranlaßt, selbst zytotoxisch zu werden und/oder gleichzeitig wichtige kostimulatorische Signale an die T-Zelle weiterzugeben (siehe Abb. 1).

Erfindungsgemäß werden im Gegensatz zum Stand der Technik intakte bispezifische Antikörper verwendet. Intakte bispezifische Antikörper sind aus zwei Antikörper-Halb-molekülen (je eine H- und L-Immunglobulinkette), die jeweils eine Spezifität repräsentieren, zusammengesetzt, besitzen darüber hinaus, wie normale Antikörper auch, einen Fc-Teil mit den bekannten Effektorfunktionen. Sie werden bevorzugt durch die Quadrom-Technologie hergestellt. Dieses Herstellungsverfahren ist beispielhaft in der DE-A-44 19 399 beschrieben. Auf diese Druckschrift wird zur vollständigen Offenbarung vollinhaltlich Bezug genommen. Selbstverständlich sind auch andere Herstellungsverfahren einsetzbar, solange sie zu den erfindungsgemäß notwendigen intakten bispezifischen Antikörpern der obigen Definition führen.

Im erfindungsgemäßen Verfahren werden kontaminierende Tumorzellen in Stammzellpräparaten (Leukaphereseprodukten) mittels bispezifischer Antikörper (wie z. B. anti-CD3 X anti-c-erbB-2, anti-CD3 X anti-Lewis Y und anti-CD3 X anti-ep-cam, beispielsweise anti-CD3 X anti-C215) in vitro eliminiert. Das Inkontaktbringen der bispezifischen Antikör-

per und der Stammzellen mit den kontaminierenden Tumorzellen erfolgt unter solchen Bedingungen, die sowohl eine Bindung der bispezifischen Antikörper an die Tumorzellen und die T-Zellen als auch die Beibehaltung der Lebensfähigkeit der Stammzellen gestatten. Die Einhaltung dieser Parameter ist für die Erhaltung und die Vitalität der Stammzellen wie auch der Lymphozyten notwendig. Beispielsweise wird das Stammzelltransplantat (Leukaphereseprodukt) etwa 4–72 Stunden, bevorzugt 24–48 Stunden, mit bispezifischen Antikörpern bei Raumtemperatur und einer Zelldichte von 30 000–75 000 Zellen/ $\mu$ l, bevorzugt 30 000–50 000 Zellen/ $\mu$ l, unter leichtem Schwenken inkubiert. Bei einer Gesamtzellzahl von ca.  $10 \times 10^9$  Zellen/Stammzelltransplantat ist eine bsAk-Menge von 100–500  $\mu$ g für die Tumorzellzerstörung ausreichend. Ein weiterer wichtiger Punkt des erfindungsgemäßen Verfahrens ist die Verwendung von sogenannten intakten bispezifischen Antikörpern. Diese sind nicht nur in der Lage (aufgrund der hier verwendeten Spezifitäten) T-Zellen an die Tumorzellen zu führen, sondern sie sind aufgrund der Effektorfunktionen des Fc-Teils darüber hinaus geeignet, mittels Complement vermittelter Lyse oder durch Bindung von Fc-Rezeptor positiven Zellen, wie z. B. Makrophagen, Monozyten oder aktivierten neutrophilen Granulozyten, Tumorzellen zu zerstören. Es können somit durch intakte bsAk mehrere tumorzell-zerstörende Mechanismen gleichzeitig aktiviert werden.

#### Beispiel

Um die Wirksamkeit von intakten bsAk bei der Tumorzellzerstörung zu quantifizieren, wurden den Leukaphereseprodukten ( $10^8$  Zellen) eines normalen Spenders (siehe Tabelle 1, Spender 2) und zweier Leukämiepatienten eine definierte Menge (0,1 %) von Tumorzellen (Brustkrebs-Zelllinie MCF-7) beigemischt. Nach 48 h Inkubation des jeweiligen Zellgemisches mit 4  $\mu$ g bsAk (bzw. keinem Antikörper oder der äquimolaren Menge der parentalen Ausgangsantikörper) bei Raumtemperatur und einer Zelldichte von 50 000 Zellen/ $\mu$ l unter leichtem Schwenken wurden die Zellen in verschiedenen Zelldichten auf 96er ( $10^5$  Zellen/Loch) und 24er ( $3 \times 10^6$  bzw.  $10^6$  Zellen/Loch) NUNC®-Zellkultur-Flachbodenplatten ausplattiert. Wie sich nach 2-wöchiger Kultivierung zeigte, war nur der bsAk in der Lage, das Tumorzellwachstum um den Faktor 1000–10 000 (log 3–4), gemessen an der Anzahl der Tumorzellkolonien/plattierten Zellen, zu reduzieren. Das Ergebnis des Tumorkolonie-Wachstums-Assays (Colonogenic A) ist in der nachfolgenden Tabelle 1 zusammengefaßt.

Tabelle 1

## Tumorkolonie-Wachstum-Assay

## Patient 1

Platte	kein Anti- körper	parentale Antikörper C215, anti-CD3	bispezifischer Antikörper BiUII anti- CD3XC215	Tumorzellen / MNCs / Loch (= 0.1%)
24	6/6 <sup>a</sup>	n.d.	0/6 $\Sigma=1.8 \times 10^7$	3000 / $3 \times 10^6$
24	6/6	n.d.	0/6	1000 / $10^6$
96	12/12	n.d.	0/12	500 / $5 \times 10^5$
96	10/12	n.d.	0/12	100 / $10^5$
Tumor- reduktion : -			>4 log	

## Spender 2

24	6/6		0/6 $\Sigma=3 \times 10^7$	5000 / $5 \times 10^6$
24	6/6	n.d.	0/6	1000 / $10^6$
96	12/12	n.d.	0/12	500 / $5 \times 10^5$
96	12/12	n.d.	0/12	100 / $10^5$
Tumor- reduktion : -			>4.3 log	

## Patient 3

24	6/6	6/6	2/6	4000 / $4 \times 10^6$
24	6/6	6/6	1/6	1000 / $10^6$
96	12/12	12/12	0/12	500 / $5 \times 10^5$
96	12/12	12/12	0/12	100 / $10^5$
Tumor- reduktion : -			3 log	

a) Anzahl der positiven Löcher (Tumorzellwachstum) von 6 bzw. 12 angesetzten Löchern nach 14 Tagen Kultivierung.

MNC = Mono-nucleated-cells

Das erfindungsgemäße Verfahren ist nicht nur zur Verringerung von kontaminierenden Tumorzellen in Stammzellpräparaten von Mammakarzinom-Patientinnen einsetzbar, obwohl es nachfolgend beispielhaft anhand von Mammakarzinompatientinnen beschrieben wird, sondern es kann beispielsweise auch zur Verringerung kontaminierender Tumorzellen in Stammzellpräparaten von Ovarialkrebspatienten oder von Patienten mit akuten oder chronischen Leukämien, Lymphomen, Hodenkarzinom oder anderen Chemotherapie sensitiven Karzinomen eingesetzt werden. Dem Fachmann sind die jeweiligen, bevorzugt zu verwendenden Antikörper bzw. Antikörperkombinationen bekannt oder sie können von ihm routinemäßig ohne erfinderisches Zutun ausgewählt und ermittelt werden.

Ziel der erfindungsgemäßen Behandlung ist somit die Heilung bzw. die Verlängerung eines krankheitsfreien Überlebens beispielsweise von Patientinnen mit Mammakarzinom, insbesondere von fortgeschrittenem Mammakarzinom, durch eine autologe Stammzelltransplantation. In einer bevorzugten Ausgestaltung der Erfindung sind die einzelnen Schritte, um dieses Ziel zu verfolgen, bei Diagnose eines Mammakarzinoms, beispielsweise wie folgt:

1. Nach Diagnose einer Metastasierung sollen – wenn immer möglich – Tumorzellen gewonnen werden. Nachweis der Antigene bzw. der Antigendichte von c-erb-B2 und ep-cam (epithelial cell adhesion molecule) auf nativen Tumorzellen mittels Durchflußzytometrie. Kryokonservierung von Tumorzellen.
2. Gewinnung autologer T-Lymphozyten aus dem peripheren Blut durch Leukapherese vor Beginn der Chemotherapie; Untersuchung einer möglichen Kontamination des Leukaphereseprodukts mit Tumorzellen durch Immunhistochemie und RT-PCR; Reinigung der T-Zell-Konzentrate von kontaminierenden Tumorzellen mit immunomagnetischen Beads.

3. 2 Zyklen einer Chemotherapie nach dem EC-Schema (Epirubicin 60 mg/m<sup>2</sup>, Cyclophosphamid 600 mg/m<sup>2</sup>, gefolgt von G-CSF (5–10 mg/kg/Tag)), Monitoring der Erholung der Hämatopoese und der Mobilisation von CD34+ Zellen nach den Zyklen.
4. Gewinnung hämatopoetischer Stammzellen aus dem Blut durch Leukapherese nach Mobilisation mit Epirubicin/Cyclophosphamid-Chemotherapie und G-CSF, wobei mindestens  $4 \times 10^6$  CD34+ Zellen/kg gewonnen werden sollen.
5. Zerstörung kontaminierender Tumorzellen im autologen Stammzellpräparat mit bispezifischen Antikörpern (anti-CD3 X anti-c-erbB-2 und anti-CD3 X anti-cp-cam, 500 µg/Patient) durch 24–48 h Inkubation bei Raumtemperatur und einer Zelldichte von 30 000–50 000 Zellen/µl. Kryokonservierung bei –180°C.
6. 2 Zyklen einer Chemotherapie nach dem ET-Schema (Epirubicin 60 mg/m<sup>2</sup> und Taxol 175 mg/m<sup>2</sup> gefolgt von G-CSF (5–10 mg/kg/Tag)). Monitoring der Erholung der Hämatopoese und der Mobilisation der CD34+ Zellen. Evtl. Durchführung einer Leukapherese für ein Back-up-Präparat.
7. 3 Wochen nach der letzten Induktions-Chemotherapie myeloablativ Hochdosis-Chemotherapie mit Thiotepa (600 mg/kg i.v.) und Melphalan (160 mg/kg i.v.).
8. Anschließende Reinfusion autologer Stammzellen.
9. 24 h nach Reinfusion Gabe von 1 mg bsAk zur Restimulation der im Stammzelltransplantat aktivierten T-Zellen und Aufrechterhaltung der Anti-Tumorreaktion mit Vorkehrungen zur Prophylaxe und Behandlung von anaphylaktoiden Reaktionen. Haagen et al. konnten in in vitro-Versuchen zeigen, daß aufeinanderfolgende Gaben von bsAk innerhalb von 3 Tagen die Zerstörung von Tumorzellen signifikant erhöhen.
10. Reinfusion autologer T-Zellen nach der hämatopoetischen Rekonstitution (etwa an Tag 14–21) nach autologer Stammzelltransplantation. Verfolgung der T-Zell-Rekonstitution im peripheren Blut durch Durchflußzytometrie unter besonderer Berücksichtigung der CD45RA/CD45RO-Ratio der T-Helfer-Zellen.
11. Gabe von bispezifischen Antikörpern (200 µg/1 mg/2 mg) in vivo in steigender Dosierung, an 3 aufeinanderfolgenden Tagen mit Vorkehrungen zur Prophylaxe und Behandlung von anaphylaktoiden Reaktionen.
12. Nachfolgeuntersuchungen: Beurteilung des Remissionsgrades, Anti-Antikörper-Reaktion gegen Immunglobulin von Maus und Ratte; Monitoring der hämatopoetischen Erholung und der Rekonstitution der T-Zell-Subpopulationen im peripheren Blut; regelmäßige Nachsorge zur Beurteilung der Dauer einer erreichten Remission. Versuche zum Nachweis von tumorspezifischen T-Zellen aus dem peripheren Blut.

Erfindungsgemäß werden somit bispezifische Antikörper zur Verminderung der Anzahl kontaminierender Tumorzellen, beispielsweise von Mammakarzinomzellen, durch deren Zerstörung in Stammzellpräparaten eingesetzt. Bei diesem Verfahren reaktivieren die Antikörper T-Zellen in die Nachbarschaft von Karzinomzellen und aktivieren die T-Zellen zur Sekretion von Zytokinen wie Tumor-Nekrose-Faktor  $\alpha$ , die zur Lyse der Tumorzelle führen. Durch die Aktivierung von Makrophagen über den Fc-Rezeptor am Fc-Teil des bispezifischen Antikörpers wird dieser Zytokin-Effekt noch verstärkt; gleichzeitig könnten der T-Zelle wichtige kostimulatorische Signale von der Fc $\gamma$ RI-Zelle (Monozyt, Makrophage, Dendrit) übermittelt werden, die eine Anergisierung der T-Zelle verhindern.

Nach erfolgter Transplantation werden bispezifische Antikörper in steigender Dosierung nach der Reinfusion von autologen T-Zellen infundiert. In vivo kommt es zu einer Aktivierung von T-Zellen und Lyse residueller Mamma-Karzinomzellen. Hier könnten ebenfalls tumorspezifische T-Zellen expandiert werden (neben dem unter Punkt 1 erwähnten Stammzellpräparat), die bis dahin aufgrund einseitiger Stimulierung am Tumor über den T-Zellrezeptor ohne Kostimulus bzw. durch IL-10-Sekretion des Tumors anerg waren.

Nach heutigem Kenntnisstand kann die Immuntherapie ihre volle Wirkung gegen autologe Tumoren nur im Stadium einer geringen Resterkrankung entfalten; die Kombination der Immuntherapie mit Hochdosistherapie und autologer Stammzelltransplantation verspricht dafür die besten Aussichten. Aus diesem Grunde sollen die T-Zellen nach Abschluß der Chemo- bzw. Strahlentherapie infundiert werden.

Die Herstellung von bispezifischen Antikörpern gehört zum Stand der Technik. Beispielsweise können in einem neu entwickelten Herstellungsverfahren (4) intakte bispezifische Antikörper in ausreichender Menge produziert werden. Die Kombination von 2 bispezifischen Antikörpern gegen 2 unterschiedliche tumorassoziierte Antigene (z. B. c-erbB-2, ep-cam, beispielsweise GA-733-2 = C215) auf den Mammakarzinomzellen minimiert die Gefahr, daß Tumorzellen, die nur ein Antigen exprimieren, unerkannt bleiben.


Das Risiko einer Reinfusion vitaler Tumorzellen mit dem T-Zellkonzentrat kann durch die Reinigung mit Antikörpern und immun-magnetischen Beads weitgehend ausgeschlossen werden. Geringe Mengen restlicher Tumorzellen sollen immunhistochemisch sowie mittels RT-PCR für das C215 Antigen bzw. CK19 nachgewiesen werden.

Wegen der möglichen Zytokinfreisetzung werden die bispezifischen Antikörper zuerst in niedriger Dosierung und unter strenger Kontrolle verabreicht. Berichten in der Literatur zufolge wurden vergleichbare bispezifische Antikörper in einer Menge bis zu 13 mg systemisch ohne wesentliche Nebenwirkungen verabreicht (3). Bei einer Antikörpermenge von insgesamt 4 mg/Patient sind demnach kaum Nebenwirkungen zu erwarten.

Nachfolgend wird die Rolle bispezifischer Antikörper bei der Kombination von Chemo- und Immuntherapie zur Zerstörung residueller Mammakarzinomzellen im Transplantat und Patienten beschrieben.

Durch eine G-CSF Behandlung, die zur Mobilisierung von Stammzellen in die Peripherie eingesetzt wird, steigt ebenfalls die Anzahl von Fc $\gamma$ RI-positiven Zellen (5). Dies beruht vor allem auf der durch G-CSF induzierten Fc $\gamma$ RI-Expression auf neutrophilen Granulozyten. Der hochaffine Fc $\gamma$ -Rezeptor I ist in der Lage, auch heterologe Ratte/Maus-bsAk der Isotypkombination Ratte-IgG2b und Maus-IgG2a zu binden (6). Diese Isotypkombination ist für die hier eingesetzten bsAk gewählt, um eine Bindung an die niedrig affineren, aber wesentlich stärker verbreiteten Fc $\gamma$ -Rezeptoren vom Typ II und III zu verhindern (6), und damit die Gefahr einer unkontrollierten Zytokinfreisetzung zu minimieren. Eine Dosis von 13 mg eines bsAk mit der sich ähnlich verhaltenden Isotypkombination Ratte IgG2b und Maus IgG1 wurde bereits in einer Phase I-Studie an Patienten getestet. Die toxischen Nebenwirkungen waren gering (Grad I in der WHO-Klassifizierung) (3), so daß die projektierte Dosis von 4 mg/Patient gut vertragen werden sollte.



Die Bindung des bsAk an  besitzt zwei wesentliche Vorteile im Hinblick auf eine optimale Anti-Tumorwirksamkeit:

- 1) FcγRI-positive Zellen besitzen die Fähigkeit, mittels ADCC Tumorzellen zu eliminieren (5), und können insofern synergistisch zur Anti-Tumorwirkung der durch den bsAk an die Tumorzelle herangeführten cytotoxischen T-Zellen beitragen (7).
- 2) FcγRI-positive Zellen sind (wie z. B. Monozyten/Dendriten) in der Lage, wichtige kostimulatorische Signale, ähnlich wie bei der Antigen-Präsentation, der T-Zelle zu liefern und damit eine Anergisierung der T-Zelle zu verhindern. Wie in Abb. 1 gezeigt, könnten weiterhin, als erwünschtes Nebenprodukt, aufgrund der durch intakten bsAk vermittelten Interaktion von T-Zelle mit akzessorischer Zelle und Tumorzelle sogar T-Zellen, deren T-Zellrezeptor tumorspezifische Peptide (über MHC Antigene auf der Tumorzelle präsentiert) erkennt, stimuliert werden. Die für eine korrekte Aktivierung der T-Zelle notwendigen Kostimuli würden in dieser Konstellation von der akzessorischen Zelle (z. B. Monozyt) geliefert werden. Insofern sollte der hier vorgestellte Ansatz neben der entscheidenden, direkten, T-Zellrezeptor-unabhängigen, durch bsAk vermittelten Tumorerstörung (Abb. 1A) ebenfalls tumorspezifische T-Zellen aktivieren und generieren (Abb. 1B), die nach Abbau der bsAk weiterhin im Patienten patrouillieren. D.h. mittels intakter bsAk könnte ähnlich wie bei gentherapeutischen Ansätzen (z. B. durch Einbau von kostimulatorischen Antigenen wie B-7 in die Tumorzelle) die Tumortoleranz im Patienten durchbrochen werden. Die in Beispiel 1 gezeigten Versuchsergebnisse im syngenem Tiermodell stützen diese Hypothese.

Günstig in diesem Zusammenhang ist weiterhin, daß die Expression von FcγRI nach G-CSF-Behandlung auf den entsprechenden Zellen hochreguliert wird und bsAk mit Fc-Anteil eine wesentlich längere Zirkulationszeit als z. B. bsF(ab')<sub>2</sub> oder bs(scFv) Antikörperfragmente besitzen, so daß wesentlich geringere Dosen intakter Ak-Moleküle für eine vergleichbare Anti-Tumorwirkung notwendig sind.

In dem hier vorgestellten Therapieansatz sollen residuelle Tumorzellen/Mikrometastasen zerstört werden. Im Gegensatz zur Behandlung solider Tumoren oder größerer Metastasen, bei denen die obenerwähnten Antikörperfragmente Vorteile besitzen könnten, da sie aufgrund ihrer geringeren Größe eine bessere Tumorenpenetration ermöglichen, sind in der Situation der Mikrometastasierung intakte bsAk mit ihren bekannten Fc-Anteil-abhängigen Effektormechanismen vorzuziehen.

Weiterhin vorteilhaft ist die Tatsache, daß in dem hier vorgestellten Applikationsschema (bis zu zwei Tagen in vitro Inkubation der autologen PBSZ mit 500 µg bsAk) keine die Therapie inhibierenden Anti-Antikörper zu erwarten sind. Da der Patient sich nach autologer Stammzelltransplantation in einem immunsupprimierten Zustand befindet, ist anzunehmen, daß gegen die 2 Wochen nach Transplantation in Kombination mit den autologen T-Zellen verabreichten bsAk noch keine Anti-Antikörper existieren.

Negative Auswirkungen der Immuntherapie mit bsAk auf das Wiederanwachsen der autologen Stammzellen sind aufgrund der gewählten Antikörperspezifitäten nicht zu erwarten.

Weiterhin können intakte bsAk durch Fusion von Ratte- und Maus-Hybridomen und anschließender Ein-Schritt-Reinigung (DE-A-44 19 399) über Protein A kostengünstig in klinikrelevanten Mengen produziert werden.

#### Literatur

1. Petersen et al., Carboplatin, Melphalan, Mitoxanthrone and Thiotepa (PANT) as a new preparative regimen in patient undergoing marrow ablative therapy for advanced solid cancer followed by peripheral blood stem cell rescue – a phase I dose escalation trial. *Experimental Hematology* 1995, 23 (8), 761 (abstract #72)
2. Fields et al. Cytokeratin 19 in bone marrow detected by PCR predicts relapses in patients with chemoresponsive metastatic breast cancer undergoing high dose chemotherapy and autologous stem cell rescue. *Experimental Hematology* 1995, 23 (8), 785 (abstract #158)
3. Weiner & De Gast, Bispecific monoclonal antibody therapy of B-cell malignancy, *Leukemia and Lymphoma*, 1995, 16: 199
4. Lindhofer et al, Preferential species-restricted heavy-light chain pairing in rat-mouse quadromas: Implications for a single step purification of bispecific antibodies, *J. Immunology* 1995, 155: 219
5. Valerius et al., Involvement of the high-affinity receptor for IgG (FcγRI, CD64) in enhanced tumor cell cytotoxicity of neutrophils during granulocyte colony-stimulating factor therapy, *Blood*, 1993, 82 931 – 939
6. Haagen et al., Interaction of human monocyte Fcγ receptors with rat IgG2b, *J. Immunology*, 1995, 154: 1852 – 1860
7. Weiner et al., The role of T cell activation in anti-CD3 x antitumor bispecific antibody therapy, *J. Immunology*, 1994, 152: 2385
8. Peters, W.P., Shell, P.J., Jones, R.B., and et al., High dose combination alkylating agents with bone marrow support at initial treatment of metastatic breast cancer. *J. Clin Oncol* 6: 1368 – 1375, 1988.
9. Antman, K., Ayash, L., Elias, A., and et al., A phase II study of high dose cyclophosphamide, thiotepa and carboplatin with autologous marrow support in women with measurable advanced breast cancer responding to standard dose therapy. *J. Clin Oncol* 10: 102 – 110, 1992.
10. Bitran, J. D., Samuels, B., Klein, L., Hanauer, S., Johnson, L., Martinec, J., Harris, E., Kempler, J., and White, W. Tandem high-dose chemotherapy supported by hematopoietic progenitor cells yields prolonged survival in stage IV breast cancer. *Bone Marrow Transplant* 17: 157 – 162, 1996.
11. Bezwoda, W.R., Seymour, L., and Dansey, R.D. High-dose chemotherapy with hematopoietic rescue as primary treatment for metastatic breast cancer: A randomized trial., *J Clin Oncol* 13: 2483 – 2489, 1995.
12. Gale et al. Autotransplants in leukaemia. *Lancet* 1989, ii: 315
13. Gribben et al. Immunologic purging of marrow assessed by PCR before autologous BMT for B cell lymphoma. *New Engl. J. Med.* 1991, 325: 1525

14. Kaneko et al. Combination of anti-CD3 and anti-CD2 stimulated lymphocytes and bispecific antibodies that efficiently lyse leukemic cells does not affect bone marrow CD34-positive stem cell function in vitro Bone Marrow Transpl. 1994, 14: 213
15. Kaneko et al. A Bispecific Antibody Enhances Cytokine-Induced Killer-Mediated Cytolysis of Autologous Acute Myeloid Leukemia Cells. Blood 81, 1993, 1333 - 41

## Patentansprüche

1. Verfahren zur Verminderung der Anzahl kontaminierender Tumorzellen in Stammzelltransplantaten ex vivo, dadurch gekennzeichnet, daß intakte bispezifische Antikörper, die sowohl an den T-Zellrezeptor-Komplex einer T-Zelle, an den Fc-Rezeptor von Fc-Rezeptor-positiven Zellen als auch an tumorassoziierte Antigene auf einer Tumorzelle binden können, mit Stammzelltransplantaten, die kontaminierende Tumorzellen enthalten können, in Kontakt gebracht werden, um die Anzahl an kontaminierenden Tumorzellen im Stammzelltransplantat zumindest zu verringern. 10
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß Stammzelltransplantate aus Patientinnen mit einem Mammakarzinom oder Ovarialkarzinom oder aus Patienten mit Leukämien verwendet werden. 15
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß als bispezifische Antikörper anti-CD3 X anti-c-erbB-2- und/oder anti-CD3 X anti-ep-cam- und/oder anti CD3 X anti Lewis Y-Antikörper verwendet werden.
4. Verfahren nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß das Stammzelltransplantat mit den bispezifischen Antikörpern für einen Zeitraum von 4-72, insbesondere 24-48 Stunden inkubiert wird. 20
5. Verfahren nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Inkubation bei einer Temperatur von 20-25°C, bevorzugt bei Raumtemperatur, erfolgt.
6. Verfahren nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Zellen im Stammzelltransplantat in einer Dichte von 30 000 bis 75 000 Zellen/µl vorliegen. 25
7. Verwendung von intakten bispezifischen Antikörpern, die sowohl an den T-Zellrezeptor-Komplex einer T-Zelle, über ihren Fc-Teil an den Fc-Rezeptor von Fc-Rezeptor-positiven Zellen als auch an tumorassoziierte Antigene auf einer Tumorzelle binden können, zur Verringerung der Anzahl kontaminierender Tumorzellen in Stammzelltransplantaten ex vivo.
8. Verwendung nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß die Stammzelltransplantate aus Patientinnen mit Mammakarzinom und/oder Ovarialkarzinom oder aus Patienten mit akuten oder chronischen Leukämien, Lymphomen, Hodenkarzinom oder anderen Chemotherapie-sensitiven Karzinomen gewonnen werden. 30
9. Verwendung des in einem Verfahren der Ansprüche 1-6 erhaltenen Stammzelltransplantats zur Reinfusion in den Patienten. 35

---

Hierzu 1 Seite(n) Zeichnungen

---

Abb.1:  
Die Rolle von akzessorischen Zellen bei der Tumor-Immuntherapie  
mittels bispezifischer Antikörper

